

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Periodic, alternating monochromatisation of polychromatic light beam - is used esp. for top illumination microscopy, and has dichroitical colour dividers, chopper and interference filters

Patent Number: DE3915421

Publication date: 1990-11-15

Inventor(s): PAFFHAUSEN WOLFGANG DIPL PHYS (DE); BECHEM MARTIN DIPL BIOL DR (DE)

Applicant(s):: BAYER AG (DE)

Requested Patent: DE3915421

Application Number: DE19893915421 19890511

Priority Number(s): DE19893915421 19890511

IPC Classification: G01J3/08 ; G01J3/12 ; G01J3/42 ; G01N21/63 ; G02B26/00 ; G02B26/04 ; G02B27/10

EC Classification: G01J3/12, G02B26/04

Equivalents:

Abstract

The monochromatisation arrangement (23) contains a filter changeover device for monochromatising a primary beam to defined wavelengths. The primary beam is divided into partial beams by a dichroitical colour divider. The partial beams are alternately passed and blocked by a chopper and monochromatised by interference filters. The monochromatised partial beams are combined into a single beam (22) with alternating wavelengths via deflection mirrors and a further dichroitical colour divider.

In the top illumination microscopy the single beam (22) is introduced to a microscope (25) which is controlled by a microcomputer (34).

USE/ADVANTAGE - For rapid periodic monochromatisation of primary beam at different discrete wavelengths with high degree of time resolution and error elimination.

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 3915421 A1

21 Aktenzeichen: P 39.15 421.1
22 Anmeldetag: 11. 5. 89
43 Offenlegungstag: 15. 11. 90

NUM

61 Int. Cl. 5:
G 02 B 26/00

G 02 B 26/04
G 02 B 27/10
G 01 N 21/63
G 01 J 3/08
G 01 J 3/12
G 01 J 3/42

DE 3915421 A1

71 Anmelder:
Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE

72 Erfinder:
Paffhausen, Wolfgang, Dipl.-Phys. Dr., 5090
Leverkusen, DE; Bechem, Martin, Dipl.-Biol. Dr., 5600
Wuppertal, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE-PS	36 04 815 C2
DE-PS	12 91 533
DE	28 22 734 B2
DE-AS	10 96 059
DE	36 29 708 A1
DE	35 39 977 A1
DE	21 47 142 A1
DD	2 16 323
GB	15 99 349
US	47 95 256
US	37 25 204

54 Verfahren und Vorrichtung zur periodischen, alternierenden Monochromatisierung eines polychromatischen Lichtstrahls und zur Fluoreszenzmessung an biologischen Zellen

Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur schnellen periodischen Monochromatisierung eines Primärstrahls bei verschiedenen, diskreten Wellenlängen. Dabei wird ein Primärstrahl mit Hilfe eines dichroitischen Farbteilers (2) in Teilstrahlen (3, 7) aufgespalten, die Teilstrahlen (3, 7) durch ein Lochblendenrad (12) alternierend freigegeben bzw. abgedunkelt und durch Interferenzfilter (17, 18) monochromatisiert. Die so monochromatisierten Teilstrahlen werden dann durch Umlenkspiegel (19, 21) und mit Hilfe eines weiteren dichroitischen Farbteilers (20) wieder zu einem einzigen Lichtstrahl (22) mit alternierender Wellenlänge zusammengeführt. Diese Monochromatisierungseinrichtung wird insbesondere zur Messung der Fluoreszenzanregung biologischer Zellen bei verschiedenen Wellenlängen benutzt. Zu diesem Zweck wird der Lichtstrahl (22) mit alternierender Wellenlänge in den Beleuchtungsstrahlengang eines Fluoreszenzmikroskops (24) geführt und die von der biologischen Zelle stammenden Fluoreszenzlichtsignale nach Auftrennung in zwei Meßkanäle A, B gemessen. Zu diesem Meßplatz gehört weiterhin ein spezieller Probenhalter (35), der eine schnelle Applikation von Test- bzw. Kontroll-Lösungen am Ort der biologischen Zellen (26) erlaubt.

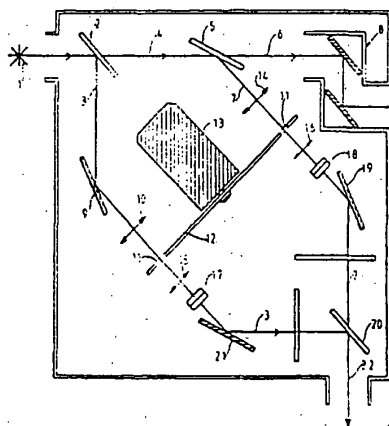


FIG 1

DE 3915421 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung zur schnellen, periodischen Monochromatisierung eines Primärlichtstrahls bei verschiedenen, diskreten Wellenlängen. Die Anordnung besteht prinzipiell aus einer Filterschalteneinrichtung zur Monochromatisierung des Primärlichtstrahles an den vorgegebenen Wellenlängen. Der polychromatische Primärlichtstrahl kann entweder durch eine technische Lichtquelle erzeugt werden, oder stammt von einem Meßobjekt, das photometrisch in Transmission, Remission, oder mit Hilfe der Streulicht- erfassung oder der Methode der Fluoreszenzanregung untersucht wird.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Betrieb dieser Einrichtung, bei dem die Fluoreszenzanregung biologischer Zellen bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wird.

Derartige Anordnungen zur periodischen Monochromatisierung finden Anwendung bei der dynamischen Untersuchung von schnell ablaufenden, photometrisch erfaßbaren Vorgängen bei verschiedenen diskreten Wellenlängen, insbesondere bei der alternierenden Fluoreszenzanregung von farbstoffmarkierten, biologischen Zellen, aber auch bei der zeitlichen Untersuchung von chemischen Reaktionsvorgängen, um Aussagen über reaktionskinetische Daten zu erhalten. In diesem Zusammenhang betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zum schnellen Lösungswechsel in einer Meßkammer, wie es für die Messung kinetischer Vorgänge mit hoher zeitlicher Auflösung erforderlich ist.

Stand der Technik

Zur Fluoreszenzanregung von biologischen Zellen wird häufig die Methode der Auflichtfluoreszenzmikroskopie verwendet. Damit können bestimmte Funktionen und Aktivitäten der biologischen Zellen, wie z.B. die Kalzium- oder pH-Regulation, meßtechnisch erfaßt werden. Dabei werden die Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften bestimmter Farbstoffe bei einer Interaktion mit zellulären Bestandteilen untersucht. Einige Farbstoffe, z.B. der Fluoreszenzfarbstoff Fura 2[®] zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration, erlauben dabei aufgrund einer spezifischen Verschiebung des Anregungswellenlängenmaximums bei Interaktion mit den Zellbestandteilen eine absolute Eichung der Messung. So kann mit Hilfe von Fura 2[®] die intrazelluläre Kalziumkonzentration weitgehend unabhängig von der verwendeten Farbstoffkonzentration in der Zelle von möglichen Zellbewegungen und von der Zellgröße absolut bestimmt werden. Die Voraussetzung hierfür ist die kontinuierliche Erfassung der Lichtemission des Farbstoffs bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (vgl. Tsien et al., Cell Calcium 6, 145 bis 157, 1985).

Die Untersuchung sehr schneller Veränderungen der Kalziumkonzentration, wie sie beispielsweise bei Herzzellen mit einer mittleren Zyklusdauer von weniger als 300 ms vorkommen, erfordern eine hohe zeitliche Auflösung der Meßtechnik und damit einen sehr schnellen Wechsel der Anregungswellenlängen. Die bisher hierfür verwendeten Systeme zum Wechsel der Anregungswellenlängen, wie Filterwechsler, Filterräder und Schwing- bzw. Drehspiegel sind entweder von der zeitlichen Auflösung her stark begrenzt oder sehr störungsempfindlich und mit hohen Intensitätsschwankungen behaftet. Die geringe zeitliche Auflösung bei einem Filterrad re-

sultiert aus dem relativ großen Trägheitsmoment aufgrund der großen bewegten Massen. Die maximal erreichbare Umdrehungsfrequenz liegt bei Verwendung mehrerer Filterpaare nur in der Größenordnung von 10 s^{-1} . Eine weitere Schwierigkeit bei Filterrädern mit mehreren Filterpaaren liegt darin, daß die Filterpaare in ihren optischen Eigenschaften (spektrale Durchlässigkeit) genau übereinstimmen müssen. Bei einem Austausch bzw. einer Erneuerung einzelner Filter kann in der Regel diese Bedingung nicht mehr eingehalten werden, so daß unter Umständen Fremdlicht mit anderen Wellenlängenkomponenten erzeugt wird (Unsymmetrien bei der Aufteilung der Strahlung auf die beiden vorgegebenen alternierenden Wellenlängen).

Die oben erwähnten Schwing- und Drehspiegelanordnungen haben den Nachteil, daß zur alternierenden Beleuchtung des Meßobjektes mit zwei Wellenlängen aufgrund der Strahlaufteilung an der Lichtquelle zwei verschiedene Volumenelemente der Lichtquelle erfaßt werden. Dies führt bei Xenon- oder Quecksilberdampflampen aufgrund von Instabilitäten des Lichtbogens in den beiden Teilstrahlen zu unterschiedlichen Intensitätsschwankungen und Veränderungen der spektralen Zusammensetzungen, die zu einer Verfälschung des Meßergebnisses führen. Außerdem sind bei Schwingspiegeln hinreichend große Schwingungsamplituden bei hohen Frequenzen nur schwierig zu realisieren.

Aufgabe

Hier setzt die Erfindung an. Es liegt die Aufgabe zugrunde, eine Anordnung zur periodischen Monochromatisierung eines Primärlichtstrahls bei alternierenden Wellenlängen, insbesondere für die Zwecke der Auflichtfluoreszenzmikroskopie mit einer hohen Zeitauflösung zu entwickeln, wobei systematische Meßfehler aufgrund mangelnder räumlicher Kohärenz der Lichtquelle und Asymmetrien bei der Aufteilung und der Wiederausammenführung der Teilstrahlen vermieden werden sollen. Außerdem sollen Energieverluste bei der Strahlaufteilung minimiert werden, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen.

Allgemeine Erläuterung und Bedeutung der Erfindung

Diese Aufgabe wird ausgehend von einer Monochromatisierungseinrichtung zur Erzeugung von Licht mit alternierenden Wellenlängen auf der Basis einer Filterschalteneinrichtung zur Monochromatisierung eines Primärstrahls an den vorgegebenen Wellenlängen erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß der Primärstrahl mit Hilfe dichroitischer Farbteiler in Teilstrahlen aufgespalten wird, daß die Teilstrahlen durch ein Lochblendenrad alternierend freigegeben und durch Interferenzfilter monochromatisiert werden, und daß die monochromatisierten Teilstrahlen durch Umlenkspiegel und mit Hilfe eines weiteren dichroitischen Farbteilers wieder zu einem einzigen Lichtstrahl mit alternierender Wellenlänge zusammengeführt werden.

Gemäß einer Weiterentwicklung der Erfindung wird die neue Monochromatisierungseinrichtung zur Messung der Fluoreszenzanregung biologischer Zellen bei verschiedenen Wellenlängen in der Weise benutzt, daß der Lichtstrahl mit alternierender Wellenlänge in den Beleuchtungsstrahlengang eines Fluoreszenzmikroskops geführt wird und die von der biologischen Zelle stammenden elektrischen Fluoreszenzlichtsignale durch einen mit dem Wellenlängenwechsel synchronisierten

Demultiplexer zwei verschiedenen Meßkanälen zugeordnet werden.

Vorzugsweise wird dabei innerhalb einer Halbperiode des Fluoreszenzlichtsignals jeweils pro Kanal ein frei definierbares Zeitfenster elektronisch vorgegeben, währenddessen das Fluoreszenzlichtsignal gefiltert, integriert und einem Sample- und Hold-Glied zugeführt wird, so daß an den beiden Ausgängen des Demultiplexers zwei den Anregungswellenlängen entsprechende analoge Meßsignale anstehen.

Mit der Erfindung werden folgende weitere Vorteile erzielt:

- Aufgrund des symmetrischen Teilstrahlengangs für die Erzeugung der alternierenden Wellenlängen ist eine hohe räumliche Kohärenz gewährleistet.
- Durch den Einsatz von dichroitischen Farbteilern werden Energieverluste gering gehalten.
- Es wird eine hohe Zeitauflösung (< 1 ms) bei hoher Frequenzstabilität erreicht.
- Bei einem Übergang auf andere Nutzwellenlängen können die Interferenzfilter im Strahlengang und gegebenenfalls auch die dichroitischen Farbteiler ohne aufwendige optische Nachjustierungen ausgetauscht werden. Die Apparatur kann also ohne allzu großen Aufwand auf andere Meßwellenlängen umgerüstet werden. Im Gegensatz dazu mußten z.B. bei Verwendung eines Filtrerrades alle Filterpaare ausgetauscht und optisch aufeinander abgestimmt werden.
- Der langwellige, nicht zur Messung herangezogene Spektralanteil der Lichtquelle kann bequem aus dem Strahlengang ausgeblendet werden, so daß eine Erwärmung der kritischen Interferenzfilter vermieden wird. Daraus resultiert eine höhere Wellenlängenkonstanz und Lebensdauer der Interferenzfilter.

Detaillierte Beschreibung

Im folgenden wird ein Ausführungsbeispiel der Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 den prinzipiellen Strahlengang für die Monochromatisierungseinrichtung zur Erzeugung von Licht mit zwei alternierenden Wellenlängen.

Fig. 2 die Monochromatisierungseinrichtung gemäß Fig. 1 in Verbindung mit einem Meßplatz zur Bestimmung der Fluoreszenzanregung von biologischen Objekten,

Fig. 3 ein Prinzipschaltbild für eine Demultiplexerschaltung zur elektronischen Zuordnung und Auswertung der Fluoreszenzlichtsignale,

Fig. 4 ein Diagramm zur Erläuterung der elektronischen Erzeugung eines Zeitfensters bei der Auswertung der Fluoreszenzlichtsignale,

Fig. 5 den prinzipiellen Aufbau des Probengebers bei dem Meßplatz nach Fig. 2,

Fig. 6 die Vorrichtung zur Applikation einer Testlösung bei dem Probengeber nach Fig. 5 und

Fig. 7 den Zeitverlauf des Fluoreszenzsignals (Response) nach einem Lösungswechsel mit Hilfe des Probengebers gemäß Fig. 5.

Monochromatisierungseinrichtung

Gemäß Fig. 1 wird das von einer Xenon-Hochdrucklampe 1 kommende Licht durch einen dichroitischen

Farbteiler 2 in zwei Teilstrahlen 3 und 4 aufgespalten. Der Teilstrahl 3 umfaßt einen Wellenlängenbereich < 360 nm und der Teilstrahl 4 den Bereich > 360 nm. Durch einen zweiten dichroitischen Farbteiler 5 wird dann aus dem Teilstrahl 4 der Wellenlängenbereich > 410 nm als Teilstrahl 6 ausgeblendet, während der kurzwellige Teil zwischen 360 nm und 410 nm als Teilstrahl 7 umgelenkt wird. Der Teilstrahl 6, der den nicht genutzten sichtbaren Anteil des Spektrums der Lichtquelle umfaßt, wird durch eine Lichtfalle 8 aus dem Strahlengang ausgeblendet. Alternativ kann der Teilstrahl 6 aber auch dazu benutzt werden, um die Lichtquelle 1 genau zu justieren.

Der Teilstrahl 3 fällt auf einen Umlenkspiegel 9 und wird durch die Linse 10 auf die Spaltflächen 11 (Lochblenden) eines mit einer Frequenz von 1000 Hz umlaufenden Chopperrades 12 fokussiert (Chopper-Motor 13). Die Chopper-Anordnung ist so gewählt, daß die Lochscheibe 12 abwechselnd die Teilstrahlen 3 und 7 frei gibt bzw. abdunkelt. Der Teilstrahl 7 wird in analoger Weise durch die Linse 14 auf den Lochspalt 11 fokussiert. Anschließend werden die beiden Teilstrahlen 7 und 3 durch die Linsen 15 und 16 parallel ausgerichtet. Das parallele Licht des Teilstrahls 3 durchsetzt dann ein Interferenzfilter 17 mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 340 nm, während das durch die Linse 16 erzeugte Parallelstrahlenbündel des Teilstrahls 7 durch das Interferenzfilter 18 mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 380 nm gefiltert wird. Nach Umlenkung durch einen Spiegel 19 trifft der bei 380 nm monochromatisierte Teilstrahl 7 nach Umlenkung durch den Spiegel 19 auf die Rückseite eines dritten dichroitischen Farbteilers 20, der für die Wellenlänge 360 nm durchlässig ist. Auf der anderen Seite wird der Teilstrahl 3 mit der Wellenlänge 340 nm durch den Spiegel 21 umgelenkt und trifft auf die Vorderseite des Farbteilers 20, an der er deckungsgleich mit dem Teilstrahl 7 reflektiert wird. Der Farbteiler 20 wird also hier dazu benutzt, um die beiden Teilstrahlen 3, 7 wieder in ein einziges Strahlenbündel 22 zusammenzuführen. Der austretende Lichtstrahl 22, dessen Wellenlänge mit einer durch die Chopper-Umdrehungszahl vorgegebenen Frequenz zwischen 340 nm und 380 nm hin und her wechselt, kann nun zur Beleuchtung eines Meßobjektes benutzt werden, dessen physikalische Eigenschaften, z.B. Remission oder Fluoreszenz, bei verschiedenen diskreten Wellenlängen untersucht werden sollen. Bei dieser Anordnung können ohne Schwierigkeiten Lichtwechselfrequenzen von 1000 s^{-1} erreicht werden, so daß die Beleuchtungseinrichtung für Meßvorgänge geeignet ist, bei denen eine Zeitauflösung von 1 ms und weniger gefordert wird.

Meßplatz für Auflichtfluoreszenzmikroskopie

Gemäß Fig. 2 wird die beschriebene Monochromatisierungs-Anordnung 23 als Beleuchtungseinrichtung in einer Apparatur für die Auflichtfluoreszenzmikroskopie zur Fluoreszenzanregung eines kalzium-sensitiven Farbstoffes bei 340 nm und 380 nm verwendet. Zu diesem Zweck wird der von der Beleuchtungseinrichtung 23 kommende Lichtstrahl 22 mit alternierenden Wellenlängen über einen weiteren Farbteiler 24 in den Objektstrahlengang eines inversen Mikroskops 25 geführt. Der Farbteiler 24 ist für Wellenlängen > 410 nm durchlässig, während die beiden UV-Komponenten des Lichtstrahls 22 an der Vorderseite reflektiert werden. Das vom biologischen Objekt 26 (Objektisch 27) emittierte

Fluoreszenzlicht wird vom Mikroskopobjektiv 28 nach dem Durchtritt durch ein Sperrfilter 29 mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 510 nm mittels eines halbdurchlässigen Spiegels 30 einerseits zu einem Okular 31 und andererseits zu einem Photomultiplier 32 als lichtempfindlichen Detektor geführt. Das Fluoreszenzlichtsignal des Photomultipliers 30 wird durch einen mit dem Chopper 12, 13 synchronisierten Demultiplexer 33 synchron zur Frequenz des Wellenlängenwechsels auf zwei Meßkanäle aufgeteilt und zur Auswertung an einen Rechner 34 weitergeleitet. Der Rechner 34 übernimmt auch die Steuerung des Objektisches 27 mittels eines Schrittmotors und eines automatisierten Probengebers 35.

Die Monochromatisierungseinrichtung 23 kann prinzipiell auch in den Detektorstrahlengang (s. Fig. 2) eingesetzt werden. In diesem Fall wird das Meßobjekt im Normalfall polychromatisch beleuchtet, während der in die Monochromatisierungseinrichtung eintretende Primärstrahl mit dem Meßlicht identisch ist.

Elektronische Meßsignalverarbeitung

Im folgenden soll anhand der Fig. 3 und 4 die Funktion des Demultiplexers 33 näher beschrieben werden.

Aufgabe des Demultiplexers ist die Trennung der sequentiellen alternierend anstehenden Meßsignale für 340 nm und 380 nm und deren elektronische Aufarbeitung sowie die zur Verfügungstellung zweier analoger Ausgangskanäle A, B der beiden Fluoreszenzsignale für die weitere rechnerische Verarbeitung.

Dem Eingang 36 wird das zu den beiden UV-Wellenlängen gehörende, vom Multiplier 32 kommende Fluoreszenzlichtwechselsignal zugeführt, während der andere Eingang 37 mit einer am Chopperrad 12 angeordneten Lichtschranke verbunden ist. Die von der Lichtschranke kommenden Triggerimpulse werden zur Synchronisation und Aufteilung der zu den beiden Meßwellenlängen gehörenden Fluoreszenzlichtsignale auf die Meßkanäle A und B benötigt. Diese Zuordnung erfolgt im Kanaltrennungsbaustein 38. Die nachfolgende Signalverarbeitung ist für beide Kanäle identisch und soll daher nur für den Kanal A (obere Hälfte in Fig. 3) erläutert werden. Im Steuerbaustein 39 werden die Zeitpunkte für ein frei programmierbares Meßfenster festgelegt. Infolge der Beugung und Brechung an den optischen Komponenten, durch kleine Dejustierungen bzw. Unsymmetrien in den beiden Teilstrahlen, vor allem aber durch die Abschattungseigenschaft des Lochblendenrades im Bezug auf die Teilstrahlen, d.h. infolge der optischen Übertragungsfunktion des Gesamtsystems wechselt das alternierende photometrische Meßsignal für die beiden Kanäle nicht rechteckig, sondern im allgemeinen trapezförmig. Dieses reale Verhalten kann durch den Steuerbaustein 39 dadurch kompensiert werden, daß nach erfolgtem Kanaltrigger für eine einstellbare Verzögerungszeit $\Delta t_v = t_1 - t_0$ der noch nicht stabilisierte Meßwert verworfen wird. Nach Ablauf dieser Zeit (ca. 100 μsec) wird der 1. Meßwert in einen Sample- und Hold-Baustein 40 geschrieben und das Meßfenster mit einer einstellbaren Breite von $\Delta t_M = t_2 - t_1$ geöffnet. Während der Dauer des Meßfensters (ca. 300 μsec) wird das analog anstehende Meßsignal in einem Filterbaustein 41 mit frei einstellbaren Filterkanten integriert und gefiltert, so daß nach Ablauf der Meßzeit in einer weiteren Sample- und Hold-Baugruppe 42 der gemittelte Meßwert für die Halbperiode des Kanals gebildet und für die nächste Halbperiode festgehalten wird. Ein nach-

folgendes einstellbares Bandpaßfilter 43 mit einem Frequenzbereich von $2 \text{ s}^{-1} \leq f \leq 2000 \text{ s}^{-1}$ eliminiert niederfrequente Störungen. An den Ausgängen A und B stehen dann die aufgetrennten analogen Meßsignale für $\lambda = 340 \text{ nm}$ und $\lambda = 380 \text{ nm}$ an. Der Vorteil dieser Meßwerterfassung und Verarbeitung liegt darin, daß "falsche" d.h. noch nicht stabilisierte Meßwerte ausgeblendet und durch die Doppel-Filterung Störungen aus dem photometrischen System (z.B. Dunkelstrom, Pulsationen der Zelle) weitestgehend unterdrückt werden. Hierdurch wird die Meß- bzw. Nachweisempfindlichkeit erheblich gesteigert und die quantitative Auswertung der stark verrauschten Fluoreszenzsignale erheblich verbessert.

Zur Erläuterung der Erzeugung des elektronischen Zeitfensters ist in Fig. 4 das Fluoreszenzlichtwechselsignal und darunter das Triggersignal als Funktion der Zeit aufgetragen. Im Idealfall wäre das Meßsignal eine Rechteckspannung; aufgrund der optischen Übertragungsverluste ergibt sich jedoch ein trapez- bzw. annähernd sinusförmiger Verlauf (gestrichelte Kurve in Fig. 4).

Zu den Zeitpunkten t_0 bzw. t_1 wird jeweils mit Hilfe des Triggersignals der Startpunkt des Meßfensters für die beiden Kanäle festgelegt. Nach einer frei einstellbaren Verzögerungszeit $t_1 - t_0$ wird für die Dauer $t_2 - t_1$ das Meßfenster für den Kanal A (340 nm) aktiviert. Die Meßzeit $\Delta t_m = t_2 - t_1$, während derer das Meßsignal im Baustein 41 geglättet und gefiltert wird, ist ebenfalls frei einstellbar.

Ausgehend vom Zeitpunkt t_2 wird nach einer einstellbaren Verzögerungszeit $t_4 - t_3$ zum Zeitpunkt t_4 das Meßfenster für den Kanal B geöffnet. Die Meßfensterbreite $t_5 - t_4$ (Meßzeit für den Kanal B für die Integration und Filterung) ist analog zur Signalverarbeitung im Kanal A ebenfalls einstellbar. Am Kanal A steht dann, wie oben schon beschrieben, das analoge Ausgangssignal für die Fluoreszenzanregung mit $\lambda = 340 \text{ nm}$ und am Kanal B das Signal für die Anregung mit $\lambda = 380 \text{ nm}$ an. Durch die beschriebene elektronische Ausblendung von Zeitfenstern im Meßsignal kann das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Empfindlichkeit der Meßanordnung erheblich verbessert werden.

Probengeber

Nachfolgend werden Aufbau und Funktion des Probengebers 35 anhand der Fig. 5 und 6 näher erläutert. Der Probengeber 35 besteht einerseits aus einem in vertikaler Richtung verfahrbaren Mikromanipulator 44, der an seiner Spitze eine Halterung zur Aufnahme von herkömmlichen Pipettenspitzen 45 und zum Befestigen einer Glaskapillare 46 besitzt und andererseits aus einer Dosiereinrichtung 47 zur Aufnahme von gebräuchlichen Einmalspritzen 48. Die Pipettenspitze 45 und die Glaskapillare 46 an der Spitze des Mikromanipulators 44 können mit Hilfe eines Schrittmotors 49 und einer daran angeordneten Spindel 50 in vertikaler Richtung präzise und reproduzierbar gehoben bzw. abgesenkt werden.

Die ebenfalls zum Probengeber 35 gehörende Dosiereinrichtung 47 besteht aus der schon erwähnten konventionellen medizinischen Spritze 48, deren Kolben mittels einer von einem zweiten Schrittmotor 51 angetriebenen Spindel 52 betätigt wird. Die Spritze 48 und die Pipettenspitze 45 bzw. die Glaskapillare 46 am Mikromanipulator 44 sind über eine bewegliche Schlauchverbindung 53 miteinander verbunden. Beim Zudosieren einer Testlösung aus der Spritze 48 wird die Spindel

52 durch den Schrittmotor 51 in definierter und reproduzierbarer Weise nach unten abgesenkt, wodurch ein vorgegebenes Volumen der Testlösung aus der Spritze 48 herausgedrückt wird. Umgekehrt kann durch ein Anheben der Spindel 52 und des mit ihm verbundenen Spritzenkolbens die Lösung wieder abgesaugt werden. Der Schrittmotor 49 des Mikromanipulators 44 und der Schrittmotor 51 der Dosiervorrichtung 47 werden von dem Rechner 34 gesteuert.

Über die Schlauchverbindung 53 können die Pipetenspitzen 45 gezielt gefüllt oder entleert werden. Die vertikale Bewegung des Mikromanipulators 44 erlaubt dabei in Verbindung mit dem motorisierten Mikroskopisch 27 (Fig. 2) das Anfahren von beliebigen Positionen des Tisches oder der Meßkammer 54, auf deren Boden die zu untersuchende biologische Probe 26 angeordnet ist. Die Meßkammer 54 ist i.a. mit einer Badflüssigkeit 55 gefüllt. Der Mikromanipulator 44 erlaubt in Kombination mit der Dosiervorrichtung 47 sowohl die genaue Abgabe einer Testlösung in unmittelbarer Nähe der biologischen Probe 26 als auch die automatische Aufnahme einer neuen Lösung. Auf diese Weise können Substanztestungen in Verbindung mit der Rechnersteuerung vollautomatisch durchgeführt werden.

Im Rahmen der pharmakologischen und physiologischen Messungen an isolierten Zellen besteht häufig die Anforderung, die Nährlösung, die die Zellen umgibt, sehr schnell gegen eine Testlösung auszutauschen, der in geeigneter Dosierung die zu untersuchenden Substanzen zugegeben wurden. Der Austausch der Lösungen an der Oberfläche der Zellen sollte dabei möglichst in weniger als 1 sec zu mehr als 90% vollzogen sein, ohne die kontinuierliche Messung zu beeinträchtigen oder die Zellen durch hohe Strömungsgeschwindigkeiten zu schädigen. Für einen solch schnellen Lösungswechsel scheidet ein Austausch des Gesamtvolumens der Meßkammer 54 von mehreren 100 µl im allgemeinen aus, da die benötigten, hohen Volumenströme zu einer sofortigen Schädigung und Zerstörung der Zellen führen würden. Bei diesem Verfahren bestehen weiterhin besonders die Probleme einer gleichmäßigen Durchmischung und konstanten Thermostatisierung der Meßkammer 54. In den bisher verwendeten Meßanordnungen können diese Probleme nur durch eine drastische Verlängerung der Austauschzeiten (auf viele Sekunden oder gar Minuten) gelöst werden.

Durch die Verwendung einer Glaskapillare 46 gemäß Fig. 6 mit einem Innendurchmesser von ca. 100 bis 1500 µm und einer Wandstärke von ca. 1000 µm, die senkrecht zum Boden der Meßkammer 54 in einem Abstand von ca. 10 µm über dem Boden konzentrisch zu den untersuchten Zellen 26 gehalten wird, entsteht im Bereich der gemessenen Zellen 26 ein von der übrigen Meßkammer völlig abgegrenzter Lösungsraum 56 mit einem Volumen von nur wenigen µl. Ein Lösungswechsel in der Meßkammer 54 hat unter diesen Bedingungen keinen Einfluß auf die zu messenden Zellen. Durch Anlegen eines Überdruckes kann aus der Öffnung der Glaskapillare 46 eine geringe Volumenmenge (ca. 10 µl) herausgedrückt und damit auf die in der Kapillare 46 weiter oben befindliche Testlösung 57 gewechselt werden. Bei einer gut zentrierten Glaskapillare mit einem exakt Bodenparallelen Öffnungsrand können dabei überraschenderweise sehr hohe Strömungsgeschwindigkeiten (bis zu 40 µl/sec) benutzt werden, ohne die Zellen zu schädigen. Die Ursache hierfür liegt in der günstigen Verteilung der Strömung an der Öffnung der Kapillare 46, da unter dem Rand der Kapillare Bereiche

mit einer sehr hohen Strömungsgeschwindigkeit entstehen, während sich in der Mitte der Öffnung in der Umgebung der Zellen ein Gebiet mit sehr geringen Strömungsgeschwindigkeiten ausbildet. Es lassen sich auf diese Weise kurze Austauschzeiten von kleiner 300 msec erzielen. Desgleichen wird die Messung auch während des Austausches der Lösungen nicht gestört.

Ein typischer Zeitverlauf bei einem Lösungswechsel mit Hilfe des Probengebers 35 und speziell der Kapillare 46 ist in Fig. 7 dargestellt. In dem Diagramm ist das relative Fluoreszenzsignal als Funktion der Zeit bei Zugabe und anschließendem Absaugen einer Fluoreszenzfarbstofflösung aufgezeichnet. Der Kurvenverlauf zeigt den Anstieg der Lichtemission bis zum Erreichen der für die Farbstofflösung typischen Fluoreszenzintensität während der Zugabe (markiert durch den linken Balken unterhalb der Meßspur) und den anschließenden Abfall auf das Kontrollniveau nach dem Absaugen der Farbstofflösung (rechter Balken). Die Wechselzeiten betragen in diesem Experiment ca. 500 ms.

Ein unkontrolliertes Vermischen von Kontroll- und Testlösung innerhalb der Kapillare vor dem Lösungswechsel wird durch eine Einschnürung 58 der Kapillare 46 auf ca. 10% ihres Querschnittes an der Grenze beider Lösungen verhindert.

Zum Befüllen der Kapillare 46 wird zunächst die Testlösung (ca. 10 bis 100 µl) aufgesaugt und anschließend wird so viel Kontrolllösung aufgesaugt, daß die Grenzfläche zwischen Kontroll- und Testlösung im Bereich der Einschnürung liegt. Befüllen und Freisetzen der Lösungen wird über die mit dem Schlauch 53 angeschlossene, rechnergesteuerte Dosiereinrichtung 47 vorgenommen. Die einzelnen Schritte zum Befüllen der Kapillare 46 und Zugeben der Testlösung können so programmgesteuert automatisch ausgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil der beschriebenen Vorrichtung zum Lösungswechsel liegt in der Möglichkeit des einfachen Auswaschens der Testlösung. Dadurch sind Versuche mit einer nur kurzanhaltenden Exposition (von ca. 1 sec) der Testlösung möglich. Dies wird durch Absaugen eines geringfügig größeren als des zugegebenen Volumens erreicht. Die Testlösung wird zurück in die Kapillare 46 gesaugt und die nachströmende Kontrolllösung 55 aus der umgebenden Meßkammer 54 wäscht die Umgebung der Zellen von der Testlösung frei und stellt die Kontrollbedingung wieder her. Auch beim Absaugen bildet sich das für die Zellen günstige Strömungsprofil mit geringen Strömungsgeschwindigkeiten im Zentrum der Öffnung aus. Beim vorherigen Austausch der Lösung in der gesamten Meßkammer 54, der auch langsam erfolgen kann, könnte während des Absaugens der Testlösung auch auf eine weitere, von der vorgenannten unterschiedliche, Testlösung gewechselt werden.

Für pharmakologische Untersuchungen besteht ein weiterer Vorteil der beschriebenen Vorrichtung in dem äußerst geringen Volumen der Testlösung (von minimal 10–20 µl), die zur Applikation und Testung einer Substanz benötigt werden. Die automatisierte Zugabe erlaubt darüber hinaus leicht die Testung von vielen verschiedenen Substanzen, wie dies im pharmakologischen Screening erforderlich ist.

Der Rechner mit der dazugehörigen Software ermöglicht eine einfache Bedienung und Steuerung des Meßvorganges sowie die Erfassung, Kalibrierung, Auswertung und graphische Darstellung der Meßergebnisse. Auch die Identifizierung und anschließende sequentielle Positionierung und Messung verschiedener biologischer

Proben (Zellen) sowie eine statistische Auswertung der durchgemessenen Zellpopulationen ist mit den erstellten Programmen möglich:

Der beschriebene Meßplatz (Fig. 2) kann zur Untersuchung von ganz verschiedenartigen Zellen verwendet und für den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe durch einfaches Austauschen der dichroitischen Farbteiler und Filter umgerüstet werden. Auch eine Erweiterung zur synchronen Erfassung verschiedener Farbstoffe in einer Zelle kann damit verhältnismäßig leicht realisiert werden. Das beschriebene Meßsystem ist insbesondere durch die Kombination einer Meßtechnik mit hoher zeitlicher Auflösung und der Möglichkeit des schnellen Lösungswechsels im Bereich der Zellphysiologie und -pharmakologie für eine breite und generelle Anwendung geeignet.

nacheinander am Ort der biologischen Zelle (26) appliziert werden.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

Patentansprüche

1. Anordnung zur schnellen periodischen Monochromatisierung eines Primärstrahls bei verschiedenen diskreten Wellenlängen, bestehend aus einer Filterumschalteneinrichtung zur Monochromatisierung des Primärstrahls an den vorgegebenen Wellenlängen, dadurch gekennzeichnet, daß der Primärstrahl mit Hilfe eines dichroitischen Farbteilers (2) in Teilstrahlen (3, 7) aufgespalten wird, daß die Teilstrahlen (3, 7) durch ein Lochblendenrad (12) (Chopper) alternierend freigegeben bzw. abgedunkelt werden und durch Interferenzfilter (17, 18) monochromatisiert werden und daß die monochromatisierten Teilstrahlen (3, 7) durch Umlenkspiegel (19, 21) und mit Hilfe eines weiteren dichroitischen Farbteilers (20) zu einem einzigen Lichtstrahl (22) mit alternierender Wellenlänge zusammengeführt werden.
2. Verfahren zur Messung der Fluoreszenzanregung biologischer Zellen bei verschiedenen Wellenlängen unter Verwendung der Monochromatisierungseinrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Lichtstrahl (22) mit alternierender Wellenlänge in den Beleuchtungsstrahlengang eines Fluoreszenzmikroskops (24) geführt wird und daß die von der biologischen Zelle (26) stammenden Fluoreszenzlichtsignale durch einen mit dem Wellenlängenwechsel synchronisierten Demultiplexer (33) zwei Meßkanälen A, B zugeordnet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb einer Halbperiode der Fluoreszenzlichtsignale frei definierbare Zeitfenster vorgegeben werden, während derer das Fluoreszenzlichtsignal gefiltert, integriert (41, 41*) und einem Sample- und Hold-Glied (42, 42*) zugeführt wird, so daß an den beiden Ausgängen A, B, des Demultiplexers (33) zwei den Anregungswellenlängen entsprechende analoge Meßsignale anstehen.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe einer offenen, unmittelbar über dem Meßkammerboden mit der zu untersuchenden biologischen Zelle (26) endenden Kapillare (46) mit einer lichten Weite von 100 µm bis 1500 µm Test- bzw. Kontrollösungen am Ort der biologischen Zelle (26) zudosiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Test- bzw. Kontrollösungen in der Kapillare (46) durch eine Einschnürung (58) räumlich voneinander getrennt bereitgehalten und

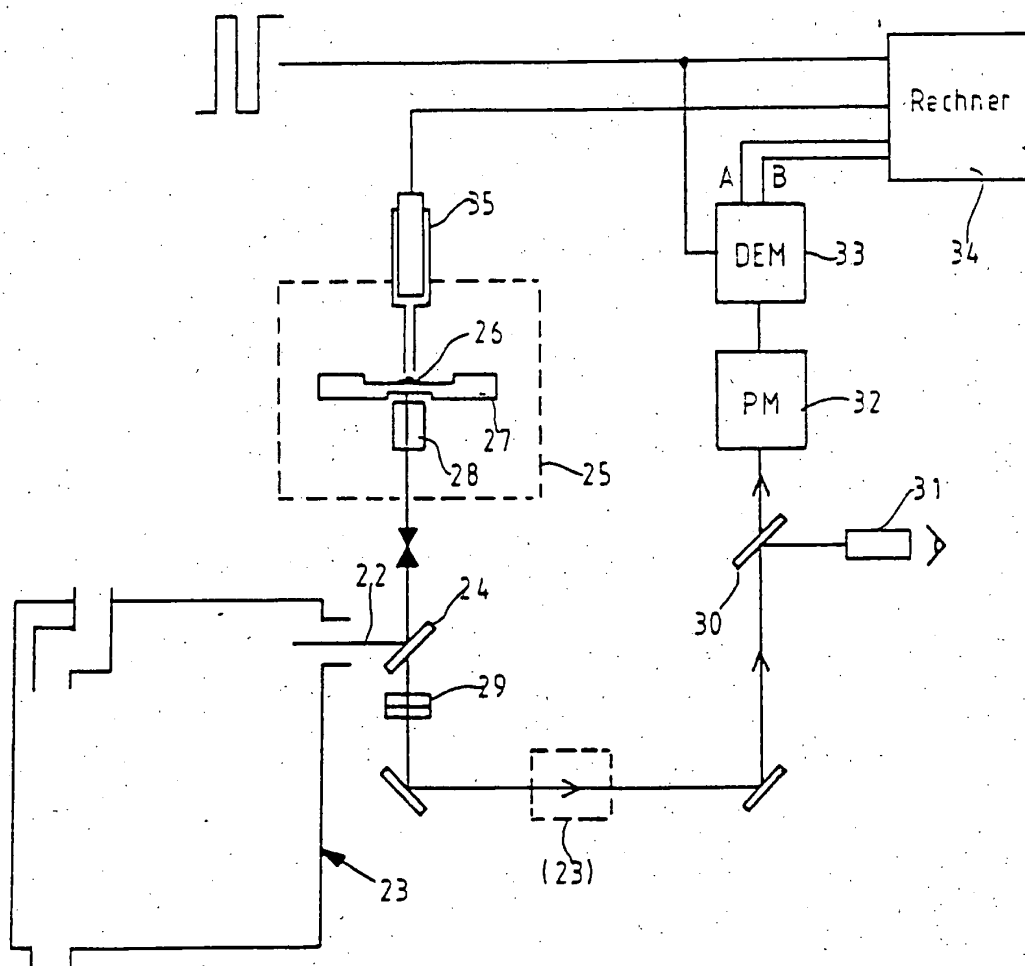


FIG.2

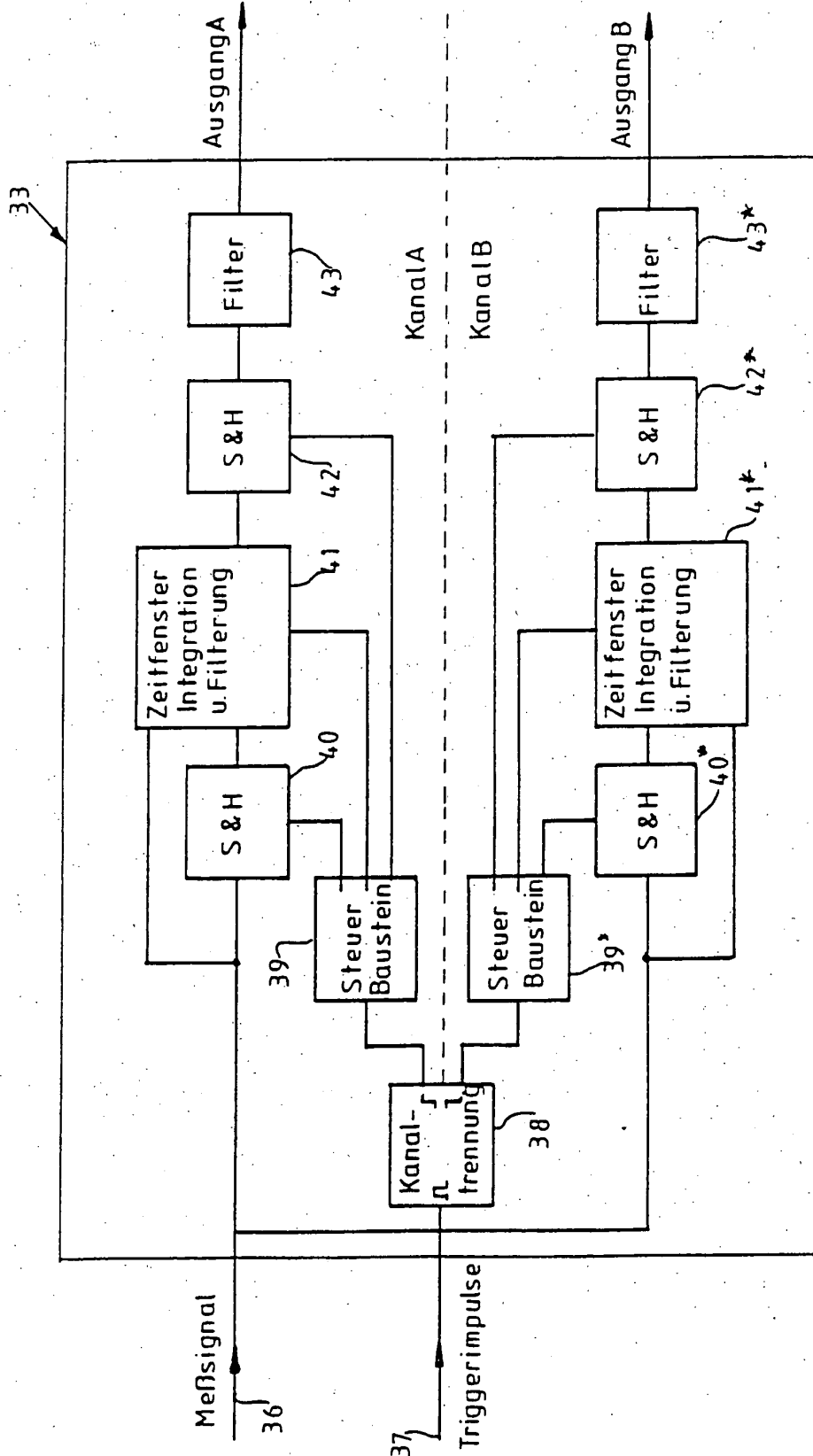


FIG. 3

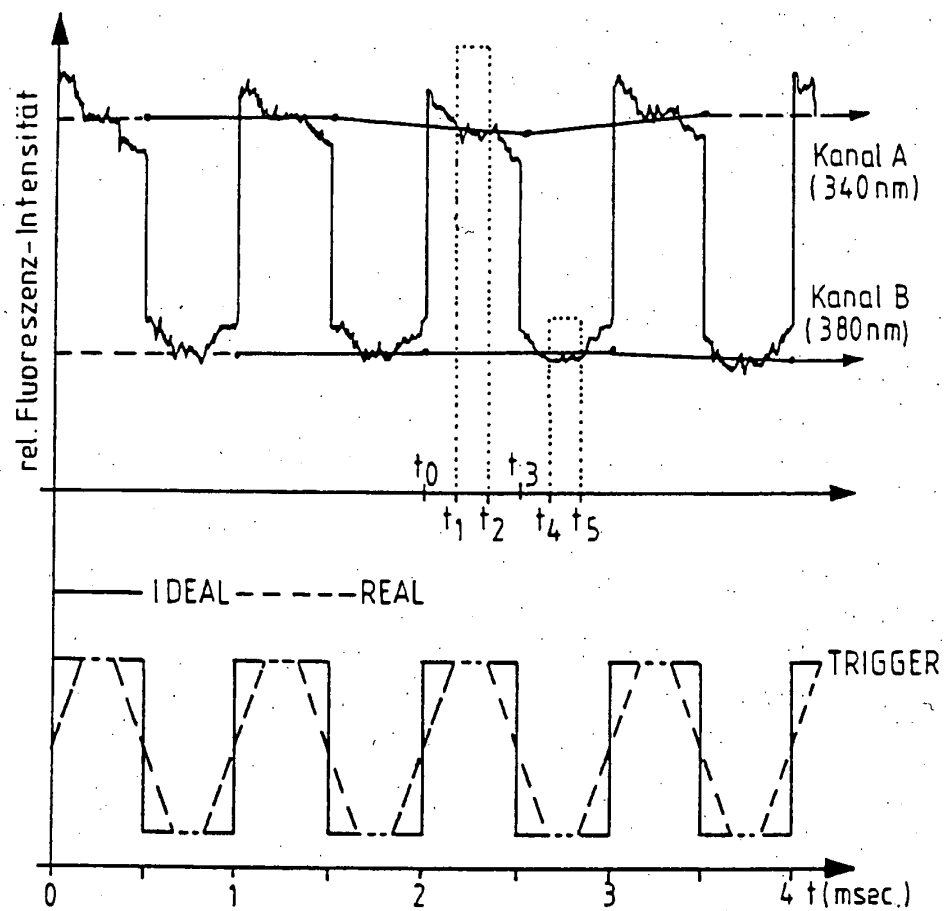


FIG.4

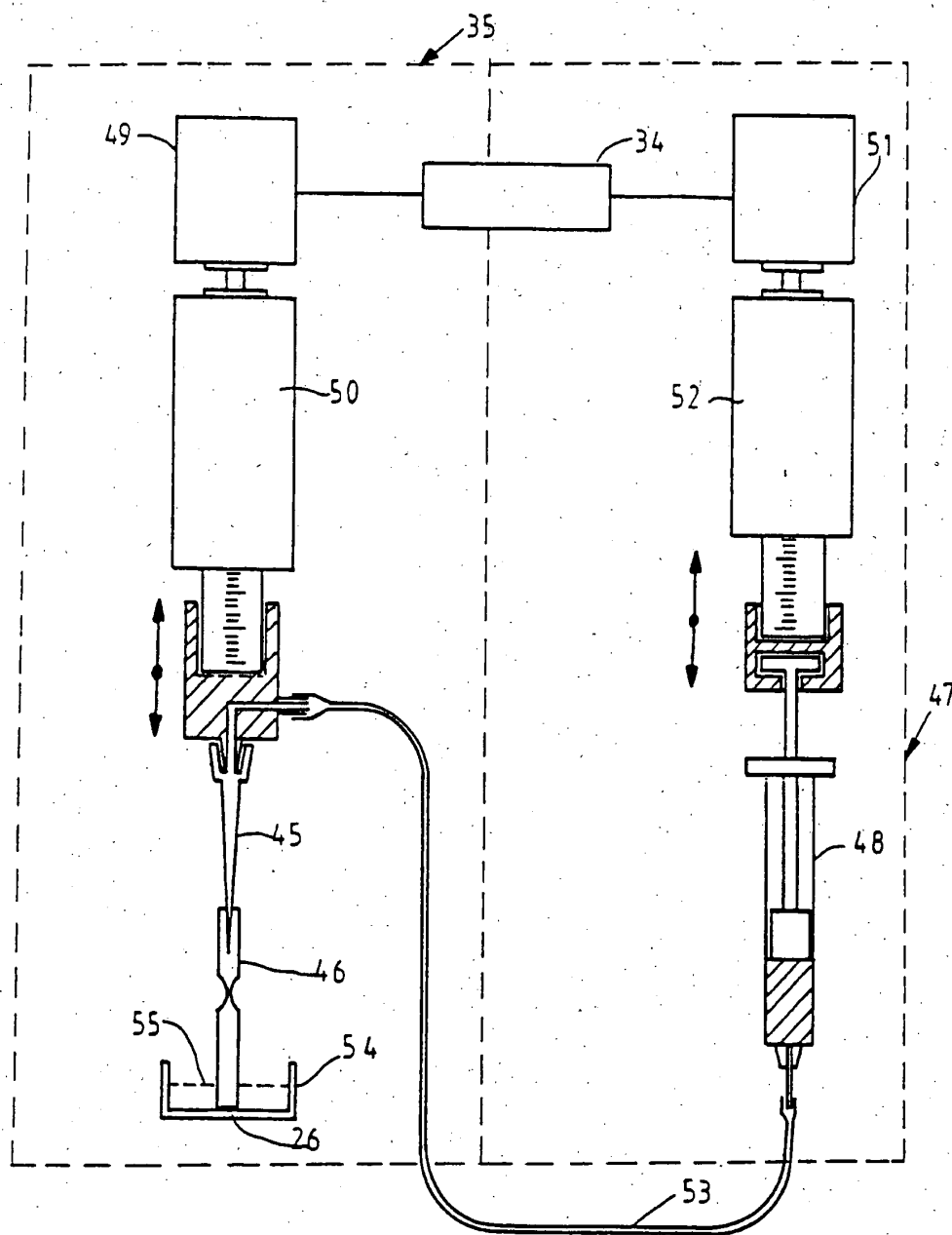


FIG. 5

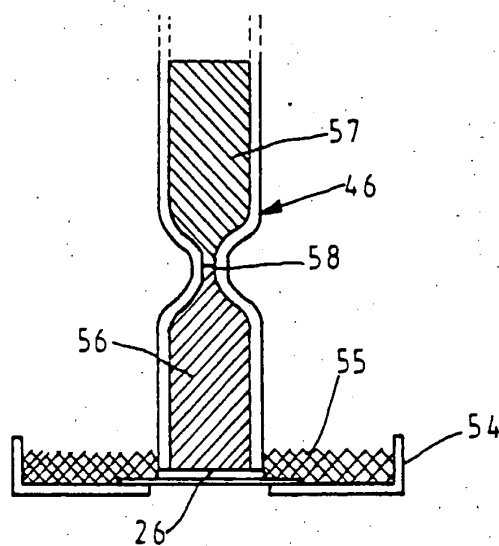


FIG. 6

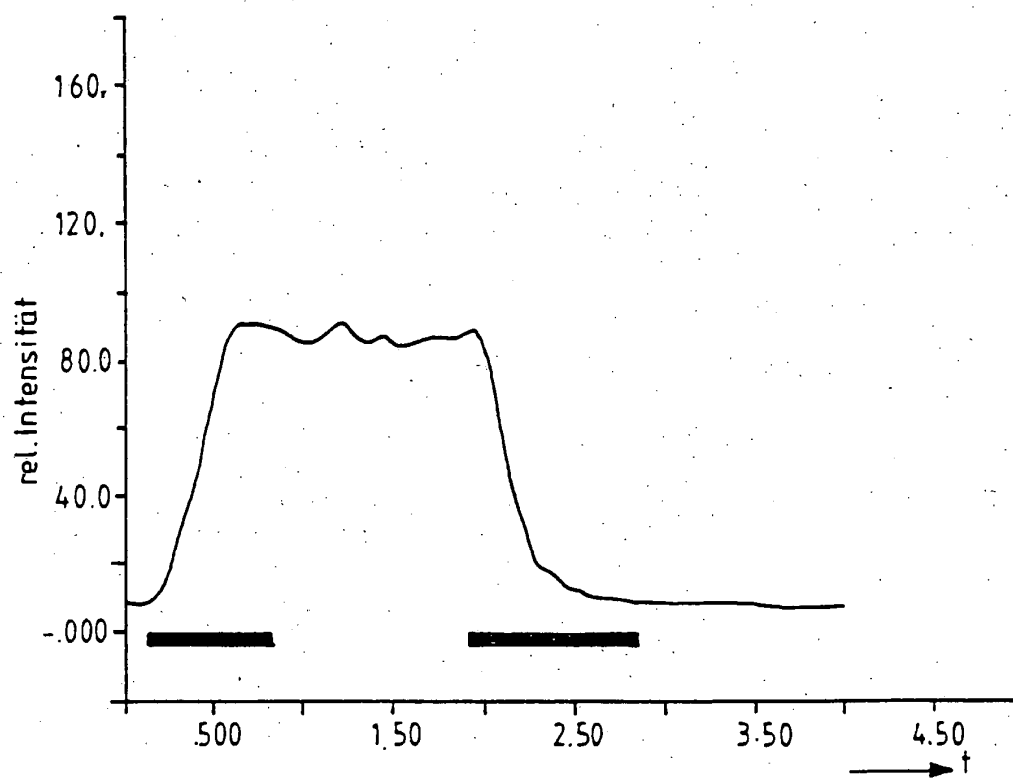


FIG. 7

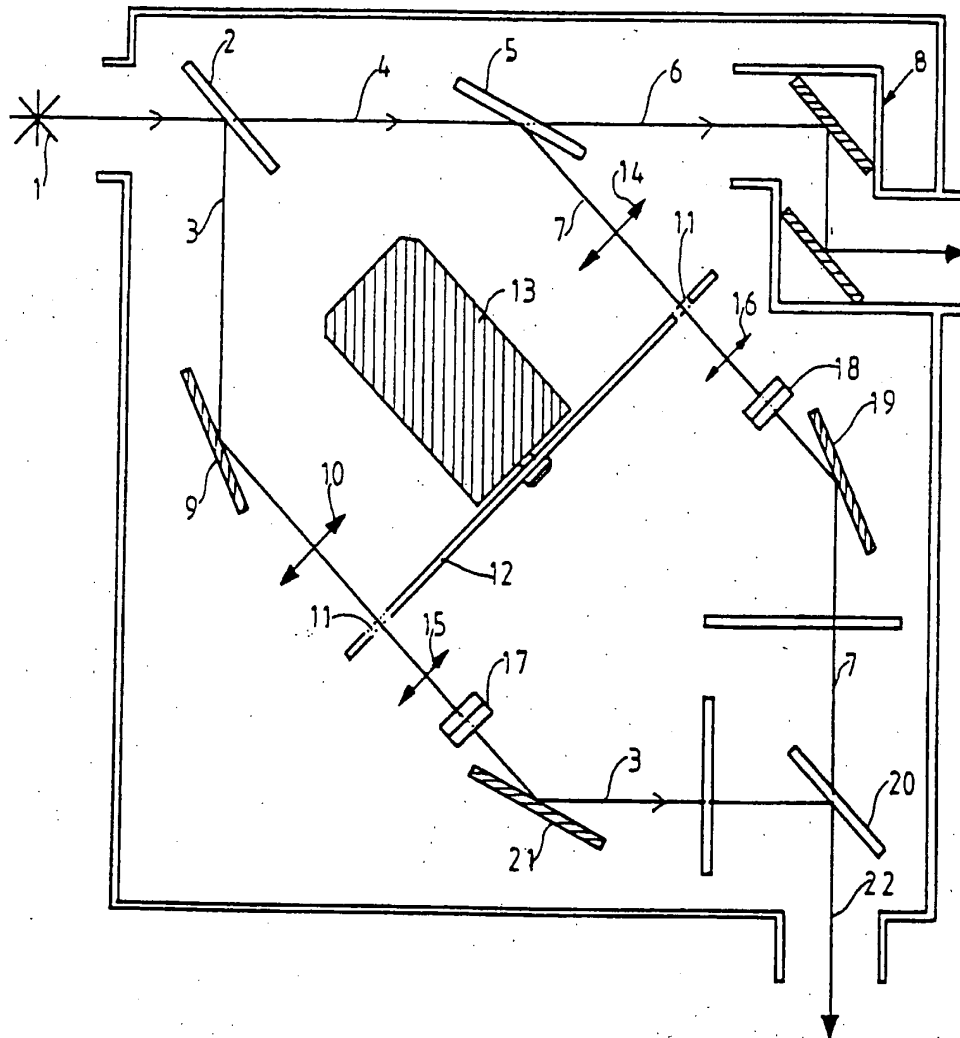


FIG.1